

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学 号：20620111151492

UDC _____



硕 士 学 位 论 文

希瓦氏菌、乙酰微小杆菌与海洋深层水原菌
在双槽式微生物燃料电池中同时产电与脱
色的研究

Feasibility Study of Simultaneous Bioelectricity Generation
and Reductive Decolorization using *Shewanella xiamenensis*,
Exiguobacterium acetylicum and Deep-Sea Culture in
Double-Chamber Microbial Fuel Cell

倪 超

指导教师姓名：卢 英 华 教 授

专 业 名 称：生 物 化 工

论文提交日期：2 0 1 4 年 5 月

论文答辩日期：2 0 1 4 年 5 月

学位授予日期：2 0 1 4 年 5 月

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT	II
第一章 绪论	1
1.1 微生物燃料电池	1
1.1.1 微生物燃料电池的背景	1
1.1.2 微生物燃料电池的反应机理.....	3
1.1.3 微生物产电检测机制	5
1.1.4 微生物燃料电池构型的对比.....	6
1.1.5 微生物燃料电池的材料应用.....	6
1.1.6 微生物燃料电池的相关参数.....	7
1.2 海洋产电微生物概论.....	9
1.2.1 铁还原红螺菌.....	11
1.2.2 沙雷菌和腐败希瓦氏菌	11
1.2.3 泥细菌	12
1.2.4 摩根菌	13
1.2.5 其它的产电微生物.....	13
1.3 希瓦氏菌.....	14
1.3.1 希瓦氏菌的研究背景	14
1.3.2 希瓦氏菌的特征和影响	16
1.4 希瓦氏菌微生物燃料电池概述	17
1.4.1 希瓦氏菌在微生物燃料电池中的前景	17
1.4.2 希瓦氏菌在微生物燃料电池中的应用和挑战.....	19
1.5 微生物燃料电池可行的研究方向	20
1.5.1 微生物燃料电池功能性菌种的筛选	20
1.5.2 微生物燃料电池产电机制建构之探讨	21
1.5.3 微生物燃料电池反应器的操作模式.....	21

1.5.4 微生物燃料电池介质化学结构探讨	22
1.5.5 微生物燃料电池之驯养条件或生物膜特性评估分析	23
1.5.6 MFC 微生物分解代谢产物成份分析	24
1.6 本研究目的	24
第二章 希瓦氏菌的鉴定	26
2.1 引言	26
2.2 实验方法	26
2.2.1 <i>16S rRNA</i> 和 <i>gyrB</i> 的鉴定方法	26
2.3 结果与讨论	31
2.3.1 <i>16S rRNA</i> 鉴定	31
2.3.2 <i>gyrB DNA</i> 鉴定	33
2.4 小结	34
第三章 细菌形态学研究	36
3.1 引言	36
3.2 实验方法	36
3.2.1 SEM	36
3.2.2 TEM 方法	38
3.2.3 SEM-EDX 方法	38
3.2.4 光学显微镜方法	39
3.3 结果与讨论	39
3.3.1 TEM 实验结果	39
3.3.2 SEM 实验结果	40
3.3.3 SEM-EDS/EDX	41
3.3.4 TEM 观测希瓦氏菌分泌的纳米颗粒	42
3.3.5 用光学显微镜观察微生物燃料电池产 PHA 情况	44
3.4 小结	44
第四章 希瓦氏菌 BC01 的产电和脱色研究	46
4.1 引言	46
4.2 实验方法	47

4.2.1 生长曲线和脱色曲线的测定.....	47
4.2.2 微生物燃料电池（MFC）的运行	48
4.2.3 MFC 性能参数的测量.....	48
4.2.4 剂量-响应曲线和 MFC 动力学分析	49
4.2.5 循环伏安法分析.....	51
4.3 结果与讨论.....	53
4.3.1 <i>S. BC01</i> 在不同培养基下生长对比.....	53
4.3.2 <i>S. BC01</i> 在不同 pH 值下的剂量-响应曲线.....	54
4.3.3 <i>S. BC01</i> 在静置条件下的生长与脱色曲线	56
4.3.4 <i>S. BC01</i> 在不同电极间距下的产电.....	59
4.3.5 微生物燃料电池的盐度、溶液电阻及电导率对比	61
4.3.6 微生物燃料电池的交流阻抗图谱.....	62
4.3.7 循环伏安法实验结果	64
4.4 小结.....	66
第五章 乙酰微小杆菌和海洋深层水原菌的产电和脱色研究.....	67
5.1 引言.....	67
5.2 实验方法.....	67
5.2.1 新型培养基之确立	67
5.2.2 脱色	70
5.2.3 产电	71
5.2.4 盐度	72
5.3 结果与讨论	72
5.3.1 新型培养基之确立	72
5.3.2 脱色能力研究.....	74
5.3.3 产电能力研究.....	77
5.3.4 电池盐度、溶液电阻及电导率研究	87
5.4 小结.....	88
第六章 结论与展望	91
6.1 结论.....	91

6.2 展望.....	92
6.2.1 循环伏安法实验探究.....	92
6.2.2 希瓦氏菌脱色酶活测定.....	94
6.2.3 盐对希瓦氏菌脱色能力的影响.....	94
6.2.4 中间调节物对希瓦氏菌的毒理影响（2AP、3AP、4AP）.....	94
6.2.5 希瓦氏菌产 PHA 的碳源优化.....	94
附 录 一.....	96
附 录 二.....	97
参考文献.....	102
在读期间发表的论文.....	111
致 谢.....	112

CONTENTS

Chinese Abstract	I
English Abstract.....	II
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Microbial fuel cell (MFC)	1
1.1.1 The background of microbial fuel cell	1
1.1.2 The mechanism of microbial fuel cell	3
1.1.3 The method to detect the electricity of MFC	5
1.1.4 Comparison on MFCs with different structures.....	6
1.1.5 The application of MFC's materials.....	6
1.1.6 Relating parameters on MFC	7
1.2 Deep sea electricity-generating microbes introduction.....	9
1.2.1 <i>Rhodospirillum rubrum</i>	11
1.2.2 <i>Shewanella oneidensis</i> and <i>Shewanella putrefaciens</i>	11
1.2.3 <i>Geobacter sulfurreducens</i>	12
1.2.4 <i>Morganella morganii</i>	13
1.2.5 Other electricity-generating microbes	13
1.3 <i>Shewanella</i>	14
1.3.1 The background of <i>Shewanella</i>	14
1.3.2 Characteristics of <i>Shewanella</i>	16
1.4 Introduction of MFC with <i>Shewanella</i>	17
1.4.1 The prospect of MFC with <i>Shewanella</i>	17
1.4.2 The challenge and application of MFC with <i>Shewanella</i>	19
1.5 The research direction of MFC.....	20
1.5.1 Separation method for species	20
1.5.2 The mechanisms of electricity-generating microbes.....	21
1.5.3 The operating model of MFC	21
1.5.4 The chemical structure of mediator.....	22
1.5.5 The analysis of biofilm	23
1.5.6 The analysis of metabolite in MFC	24
1.6 Research object	24
Chapter 2 Genetic identification of <i>Shewanella</i>	26

2.1 Introduction	26
2.2 Experimental method.....	26
2.2.1 The identification method using <i>16S rRNA</i> and <i>gyrB</i>	26
2.3 Result and discussion	31
2.3.1 <i>16S rRNA</i> identification.....	31
2.3.2 <i>gyrB DNA</i> identification	33
2.4 Short conclusion.....	34
Chapter 3 Research on <i>Shewanella</i>'s morphology	36
3.1 Introduction	36
3.2 Experimental method.....	36
3.2.1 SEM.....	36
3.2.2 TEM.....	38
3.2.3 SEM-EDX.....	38
3.2.4 Opticla microscopy.....	39
3.3 Result and discussion	39
3.3.1 Result of TEM.....	39
3.3.2 Result of SEM.....	40
3.3.3 Result of SEM-EDS/EDX	41
3.3.4 Observing nanoparticle using TEM	42
3.3.5 Observing PHA using optical microscopy	44
3.4 Short conclusion.....	44
Chapter 4 Comparison on MFC with <i>S. BC01</i>	46
4.1 Introduction	46
4.2 Experimental method.....	47
4.2.1 Growth curve and decolorization curve.....	47
4.2.2 The operation of MFC	48
4.2.3 Parameters of MFC	48
4.2.4 Dose-response curve.....	49
4.2.5 Cyclic Voltammetry	51
4.3 Result and Discussion	53
4.3.1 Comparison on <i>S. BC01</i> with different media	53
4.3.2 Dose-response curve with different pH.....	54
4.3.3 Decolorization curve and growth curve of <i>S. BC01</i>	56
4.3.4 Electricity generation of <i>S. BC01</i>	59

4.3.5 Salinity, resistance and conduction of <i>S. BC01</i>	61
4.3.6 EIS of <i>S. BC01</i>	62
4.3.7 Result of Cyclic Voltammetry	64
4.4 Short conclusion.....	66
Chapter 5 Research on <i>Exiguobacterium acetylicum</i> and DSW	67
5.1 Introduction	67
5.2 Experimental method.....	67
5.2.1 The establishment of new medium.....	67
5.2.2 Decolorization	70
5.2.3 Electricity generation.....	71
5.2.4 Salinity	72
5.3 Result and Discussion	72
5.3.1 The establishment of new medium.....	72
5.3.2 Research on decolorization.....	74
5.3.3 Research on electricity generation	77
5.3.4 Salinity, solution resistance and conductivity.....	87
5.4 Short conclusion.....	88
第六章 Conclusions and prospects.....	91
6.1 Conclusions	91
6.2 Prospects.....	92
6.2.1 Further research of Cyclic Voltammetry	92
6.2.2 Measurement of enzymatic activity on <i>Shewanella</i>	94
6.2.3 The impact of inorganic salts on <i>Shewanella</i>	94
6.2.4 Research on toxicity of mediators(2AP, 3AP, 4P).....	94
6.2.5 Optimization of PHA generated by microbes.....	94
Appendix 1	96
Appendix 2	97
References.....	102
Publications	111
Acknowledgements	112

摘 要

随着人类对可持续能源需求的不断扩大,微生物燃料电池以其环保的优点被认为是当前生物产电最具潜力的方法之一。本论文筛选了适于微生物燃料电池的希瓦氏菌种,继而采用基因手段进行菌种鉴定,使用多种电镜手段观察其形态结构及产电机理,并在真实双槽式微生物燃料电池(double-chamber microbial fuel cell, 以下均简称 DC-MFC)中进行希瓦氏菌(*Shewanella xiamenensis* BC01, 以下均简称 *S.* BC01)产电和脱色研究,并与乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum* NIU-K2/NIU-K4, 以下均简称 *E.* NIU-K2/NIU-K4)和海洋深层水原菌(Deep-Sea Water Culture, 以下均简称 DSW)的性能进行对比。

首先,对从台湾海峡海域的水体中筛选的一株产电菌通过 16S rRNA 鉴定,确定该微生物为 *Shewanella xiamenensis* BC01。

通过 TEM 观测到 *S.* BC01 单个菌长度范围为 2-3.25 μm , 宽度范围为 0.5-0.75 μm , 形态为棒状杆菌。使用 SEM JSM6390 观察希瓦氏菌, *S.* BC01 单个菌的长度范围为 1.1-2.1 μm , 宽度范围为 0.5 μm 左右, 形态为棒状杆菌。使用高倍 SEM LEO1530 观察, *S.* BC01 单个菌的长度范围为 0.9-1.3 μm , 宽度范围为 0.5 μm 左右, 形态为棒状杆菌。希瓦氏菌不仅具有纳米导线,还可以产生纳米颗粒,纳米颗粒的直径为 0.15-0.20 nm。说明希瓦氏菌的产电机理极可能是由纳米导线进行电子传递,这为进一步阐明希瓦氏菌的导电机理奠定了基础。

最后,本研究尝试以海生菌肉汤(MB)作为外加营养源,利用其成分简单,价格低,符合海洋产电菌特性等特点应用于培养 *S.* BC01, 试图代替 Luria-Bertani 培养基(LB)。*S.* BC01 在 0.5 \times MB(稀释 2 倍的 MB)中的生长效果最好。其生长的最适 pH 值范围在 5.3~7.0, 最大比生长速率(SGR)为 0.78 h^{-1} , 最大比脱色速率(SDR)为 82.63 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 适合于同时产电和脱色的微生物燃料电池,菌体生长和脱色之间存在争夺电子的竞争关系。*S.* BC01 的最佳间距为 12.4 cm; 其平均电压、溶液电阻和电荷转移电阻分别为 278.9 mV, 30.73 Ω , 176 $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$, 稳定周期为 54 天, 一级速率衰减常数(k_1)和二级速率衰减常数(k_2)分别为

140 d⁻¹ 和 4.12 d⁻¹，这些结果再与 *E. NIU-K2*/*NIU-K4*、DSW 进行性能对比，可为今后深入研究希瓦氏菌的产电性能提供一定的科学依据。

关键词：希瓦氏菌；双槽式微生物燃料电池；染料脱色；乙酰微小杆菌；海洋深层水原菌

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

As the human's demand for sustainable resources is increasing, microbial fuel cell is regarded as one of the most potential method of bioelectricity generation due to its environment-friendly feature. In this essay, *Shewanella* strains which could be used in microbial fuel cell (MFC) was separated. Then the microbe was identified using genetic method, the morphology and electricity generation mechanisms were observed using different kinds of electron microscopy. In real double-chamber microbial fuel cell (DC-MFC), the electricity generation and decolorization performance of *Shewanella xiamenensis* (abbreviated as *S.* BC01) were assessed, compared with *Exiguobacterium acetylium* NIU-K2/NIU-K4 (abbreviated as *E.* NIU-K2/NIU-K4) and deep-sea water culture (abbreviated as DSW).

First, a strain of electricity generation microorganism was separated from the sea area of Taiwan Strait and identified by *16S r RNA*, and the identification result showed that it was *Shewanella xiamenensis* BC01.

Using TEM observation, the length of *S.* BC01 was 2-3.25 μm , the width of *S.* BC01 was 0.5-0.75 μm , the shape was rod shape. Using SEM JSM6390 observation, the length of *S.* BC01 was 1.1-2.1 μm , the width of *S.* BC01 was 0.5 μm , the shape was rod shape. Using SEM LEO1530 observation, the length of *S.* BC01 was 0.9-1.3 μm , the width of *S.* BC01 was 0.5 μm , the shape was rod shape. *S.* BC01 not only has nanowire, which can transmit electrons, but also it can secrete nanoparticle, whose diameter is 0.15-0.20 nm. This implied that the electricity-generating mechanism of *Shewanella xiamenensis* BC01 may relate to nanowire, laying a foundation for finding the mechanism of electricity-generating.

At last, this research tried to add Marine Broth (MB) as additional because of its simple composition, cheap price and enough nutrients to apply to the growth of *S.* BC01, trying to substitute for LB. *S.* BC01 in 0.5 \times MB grew fastest, the optimized pH

for growth ranged from 5.3 to 7.0, SGR was 0.78 h^{-1} , SDR was $82.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The MFC with *Shewanella* is suitable for simultaneously electricity-generation and decolorization, and the growth of microorganism competed with decolorization for electrons. The optimized electrode distance of MFC with *S. BC01* was 12.4 cm. The average voltage, solution resistance and charge transfer resistance were 278.9 mV, 30.73Ω , $176 \Omega \cdot \text{cm}^2$, respectively. The steady period came after 54 days, the first level of decay rate and the second level of decay rate were 140 d^{-1} and 4.12 d^{-1} , respectively, compared to the result of *E. NIU-K2/NIU-K4*, DSW. These results provide a solid basis for further research to compare with.

Key words : *Shewanella xiamenensis* BC01; DC-MFC; dye decolorization; *Exiguobacterium acetylicum*; DSW Culture

第一章 绪论

1.1 微生物燃料电池

1.1.1 微生物燃料电池的背景

一般来讲，很多不同的细菌可以在阳极生物膜产生能量。已经发现了变性细菌(*Proteobacteria*)、硬壁菌(*Firmicutes*)、酸杆菌(*Acidobacteria*)和希瓦氏菌(*Shewanella*)能够产生电流。由于氧化还原酶在外膜的存在，毕赤酵母可以在微生物燃料电池中产生电流^[1]，集胞藻被发现能够生长出可导电附属物，成为纳米导线^[2]。能够胞外电子传递的微生物被定义为胞外产电菌(exoelectrogens)或电化学活性细菌。研究纯菌发电时可以发现许多胞外产电菌产生较低的功率密度。

对于高密度产生功率的细菌来说，目前微生物燃料电池中能产生最高功率密度的微生物燃料电池在阳极接种了混合菌。功率密度的大小经常依赖于微生物燃料电池的结构，比如：电极间距和燃料电池溶液的导电性。因此，当研究的微生物燃料电池的结构和使用的溶液是一致的时候，胞外产电菌产生的功率密度可以直接地被进行比较。同时，系统内阻需要足够的小，从而确保不同种属的细菌可以被区分^[3]。比如：由于较高的内阻，使用泥土杆菌(*Geobacteraceae*)的双槽式微生物燃料电池会产生较低的功率密度。使用低内阻的反应器，能产生较高功率密度的 α 变型菌首次从微生物燃料电池中被分离出来，甚至比混合菌产生了更高的功率。

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)是第一个被发现不需要外加介质而能产电的微生物。希瓦氏菌在细胞外的电子传递机制到目前为止还是存在争议。拥有膜外细胞色素的希瓦氏菌属可以通过直接接触来进行电子传递，也可以通过形成电化学活性的纳米导线来进行。进一步讲，沙雷菌(*Shewanella oneidensis*)能产生被认为是电子梭的核黄素^[4]。

研究异化金属还原菌(dissimilatory metal reducing bacteria)的研究者通过使用铁氧化物首次揭示了通过直接接触外膜色素和电子梭这两种方式的电子传递机制。有证据表明，纳米导线在电子传递中能成为第三种方式。近来，有报道指

出,沙雷菌 MR-1 产生的纳米导线在纳米导线的纵向长度上产生了非线性的电子特征^[5]。

如图 1.1 所示,微生物胞外产电的电子传递机制至少可以包括三类。第一类是细胞在固体金属氧化物存在的条件下进行的呼吸作用。末端氧化酶可以在呼吸链将电子释放给细胞外的三价铁 (Fe(III)), 产生可溶性的二价铁 (Fe(II))。第二类是细胞直接将电子相互传递, 而不需要通过介质。不同菌种之间可以进行电子传递的直接证据是喜温发酵菌 (*Pelotomaculum thermopropionicum*) 通过导电末端与噬热产甲烷古菌 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*) 相连接^[2]。外源电子传递的第三个原因可能与细胞间的交流功能有关, 病原菌绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 能够产生名为绿脓菌青素的化学物质, 作为群感效应控制基因调节的信号^[6]。绿脓菌青素在微生物燃料电池中对于电流的产生也是一种电子梭。

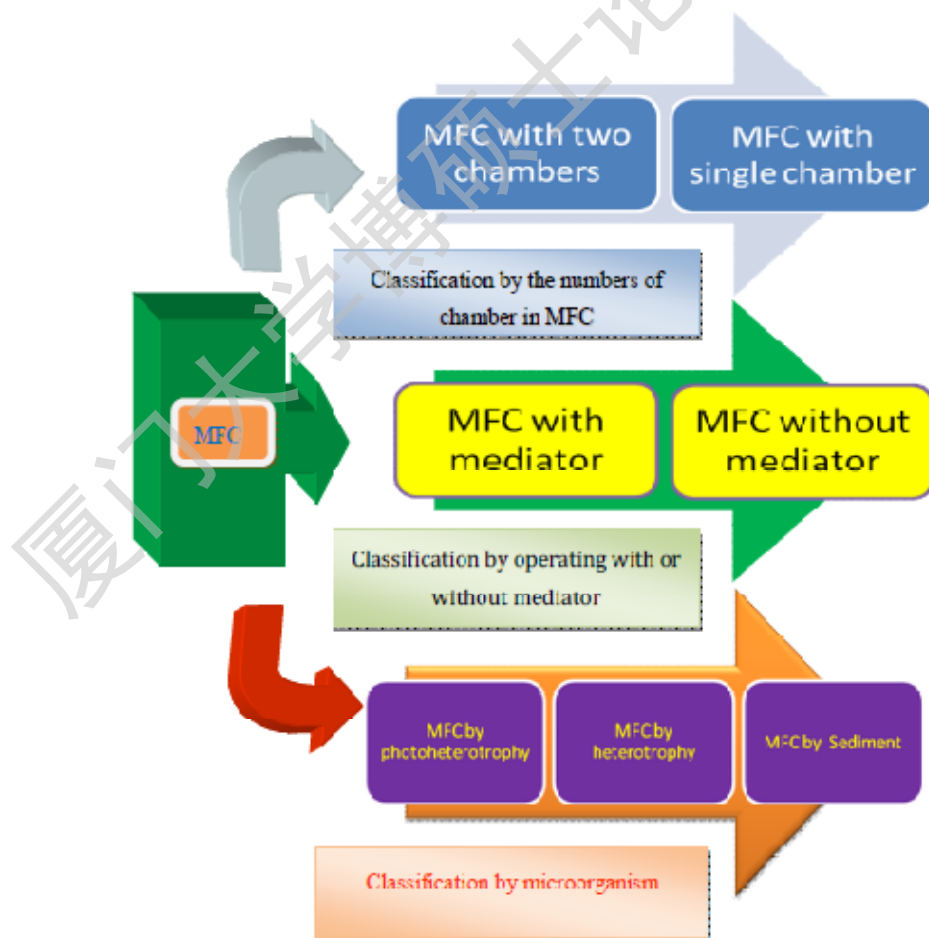


图 1.1 微生物燃料电池反应机制

Fig.1.1 Classification of microbial fuel cells on three aspects

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库